

高分子物質에 Heparin의 고정화

Covalently Immobilized Heparin Materials

조 종 수*

序 言

最近에 高分子가 갖는 機能性에 점점 시선이 집중되어 耐熱性材料나 導電性材料가 高分子材料에 要求되는 기능을 나타내고 있는 것과 같이, 醫用材料도 生體機能을 代行하고 통제하는 기능을 나타내는 材料이다. 이러한 醫用材料에서 基本的으로 갖추어야 할 것은 生體 또는 그의 構成要素에 대하여 適合하는 機能, 즉 生體適合機能을 갖는 것이다. 그러나 生體適合性이라고 말하여도 그의 材料가 적합해야 할 부위에 있어서 生體反應은 여러가지로서 한꺼번에 이야기하는 것은 어렵고 그중에서도 일반적으로 醫用材料과 血液과의 適合性(血液適合性)에 대하여 많은 연구가 진행되고 있다.¹⁻⁷

혈액적합성을 얻기 위해서는 첫째 血栓形成反應의 經路를 抑制하든지 둘째는 血栓形成을 통제하는 機能을 材料에 부여하는 방법으로 이것은 血栓形成反應이 주로서 어느 部分을 阻止하느냐에 따라 분류한 것이다.⁸ 또한 材料設計의 접근에서 분류해보면 첫째는 藥學的으로 線溶系活性化酵素(urokinase)나 血栓形成을 抑制하는 生理活性物質(heparin, prostaglandin)을 材料表面에 부여하거나, 둘째는 surface energy의으로 설계하여

혈액적합성을 좋게하는 것으로 여기에서도 제1단계에서 일어나는 재료표면에서의 血小板의 物理吸着을 억제하는 hydrogel 계⁹ 및 親水性材料가 있고, 제1단계에서 흡착된 血小板의 活性化(제2단계)를 억제하는 microdomain구조를 갖는 block 공중합체, graft 공중합체, 또한 多相系高分子의¹⁰ 血小板 活性化 抑制 形成材料가 있다.

醫用材料과 같은 異物質이 혈액중에 삼입되면 血栓이 形成되는데 이러한 血液凝固 mechanism은 아직도 확실히 밝혀지지 않았지만, 그중 대표적인 혈액응고과정은 Fig. 1에 나타내는 바와 같이 內因系와 外因系가 있는데 어느 경로를 통하든지 간에 결국에는 fibrinogen이 thrombin에 의해 해중합되어 fibrin monomer와 fibrin polymer를 형성한다고 알려져 있다.¹¹ 인공심장, 인공혈관, 인공밸브 및 인공신장과 같은 의료재료의 개발에 큰 문제점이 되고 있는 것이 혈전형성으로서 이러한 문제를 해결하기 위하여 상기한 바와 같은 항혈전성 고분자재료 개발에 여러 방법이 사용되고 있지만 저자는 그중에서 혈전형성을 저지하는 생체물질인 heparin을 고분자에 고정시키는 것에 대하여 서술코자 한다. 지면관계상 그중에서도 여러가지 고분자와 heparin과의 共有結合에 대해서만 다루고자 한다.

* 전남대학교 고분자공학과(Chong-Su Cho, Department of Polymer Engineering, Chonnam National University, Kwangju 505, Korea)

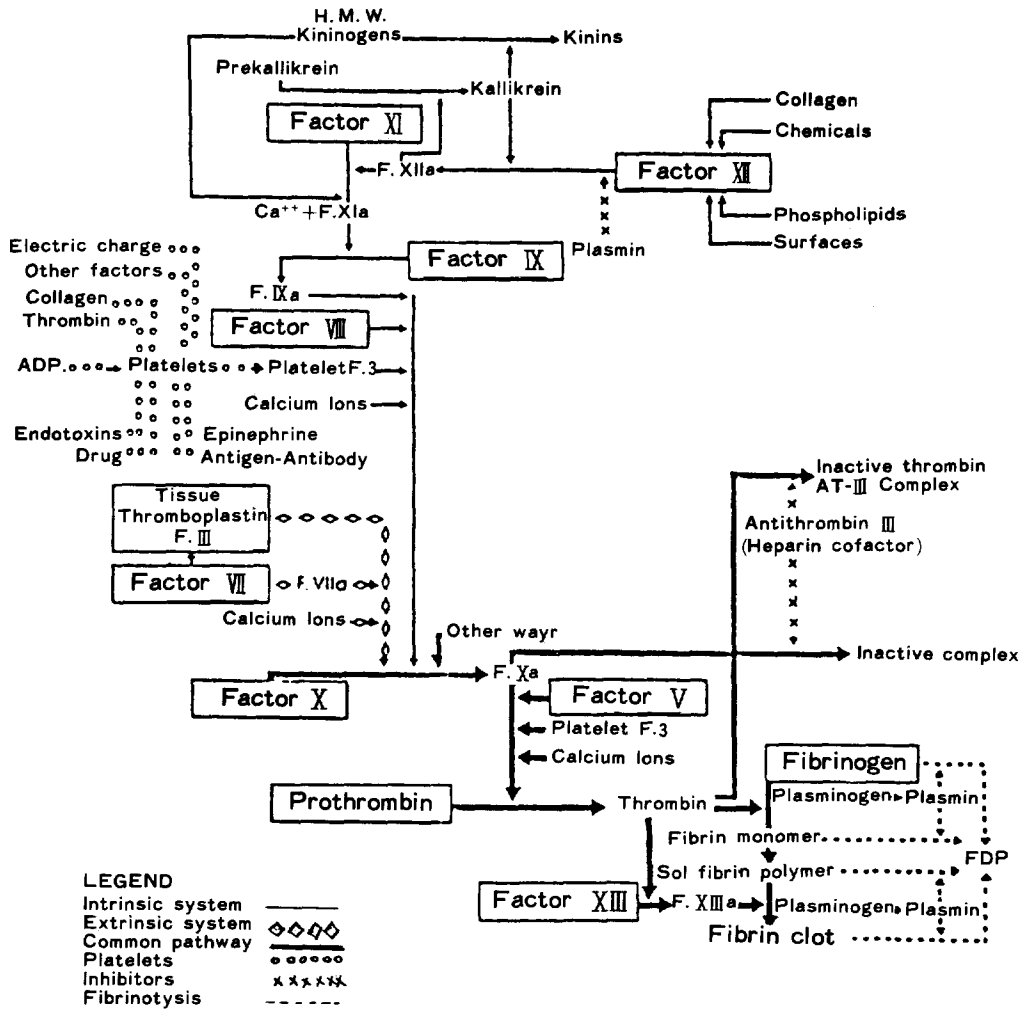


Fig. 1. Coagulation cascade of blood

Heparin의 고정화

Heparin의 구조와 기능

Heparin의 구조 (시판상의 90% 이상)는 Fig. 2에 나타난 바와 같이 2,6-disulfoglucosamine, 2-sulfoiduronic acid 그리고 glucuronic acid가 3:2:1의 비율인 六糖類로 구성된 linear한 음성고분자 다당류로서 毛細血管이 많은 간장, 췌장등에서 많이 얻어진다.¹² sugar unit구성, 제조부위, 그리

고 제조방법에 따라서 분자량은 3,000에서 37,500까지의 범위에 있고 그중 어느 범위에 있는 것만이 항혈전성이 있다고 알려져 있다.¹³ heparin의 혈액 응고 기능에 대해서는 여러가지 학설이 많지만 그중에서도 널리 받아들여지고 있는 것은 heparin이 antithrombin III (AT-III)와 결합함으로써 AT-III가 혈액응고인자인 XIIa, XIa, Xa, IXa, 그리고 thrombin의 기능을 중화시키는 일을 촉진한다고 알려져 있다.¹⁴

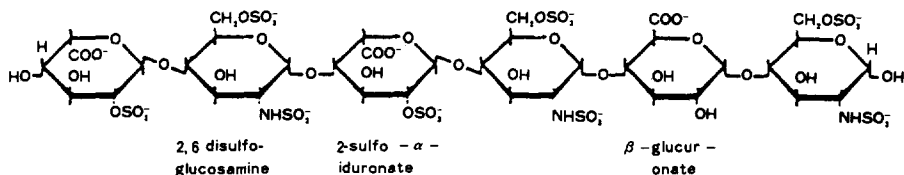


Fig. 2. Structure of heparin hexasaccharide. A chain of six sugars is shown : three molecules of 2,6 disulfoglucosamine alternate with the uronic acids, 2-sulfoiduronic and unsulfated glucuronic acid. The major constituents of heparin are represented by this hexasaccharide, $2 \times (2,6\text{-disulfoglucosamine-2-sulfoiduronic acid}) - (2,6\text{-disulfoglucosamine-glucuronic acid})$.

관능기의 선택과 항혈전성

高分子에 heparin을 고정화 할때 heparin에서 가능한 관능기는 Fig. 3에¹⁵ 나타낸 바와 같이 $-\text{NH}_2$ 기, $-\text{OH}$ 기, $-\text{COOH}$ 기, 및 $-\text{SO}_3\text{H}$ 기 들로서 heparin에 함유되어 있는 양과, 이들이 blocking 되었을 때의 항혈전성에 대하여도 같이 나타났다. $-\text{OH}$ 기와 $-\text{COOH}$ 기는 heparin에 비슷한 양으로 가지고 있고 그중 10~20%정도 blocking되면 그대로 생물활성은 유지된다. $-\text{NH}_2$ 기는 $-\text{OH}$ 기나 $-\text{COOH}$ 기에 비하여 1/100정도 함유되고 있고 이것이 blocking되어도 생물활성은 별로 영향을 받지 않는다. $-\text{SO}_3\text{H}$ 기는 $-\text{COOH}$ 기에 비하여 약

두배 정도 되고 그중 $-\text{NSO}_3\text{H}$ 기가 단지 7~8%만 blocking되어도 활성을 잃어 버리기 때문에 이것이 항혈전성에서 중요한 인자가 되고 있음을 나타내고 있다.

고정화 방법

고분자에 heparin을 고정화하는 방법은 Fig. 4

Heparin	NH_2	OH	COOH	$\text{O-SO}_3\text{H}$	$\text{N-SO}_3\text{H}$
Potential attachment groups					
	Concentration (mole/mg hep)				
	Effect of blocking on anticoagulant activity				
OH	$\sim 2 \times 10^{-4}$	10~20% block : minimal loss (APTT)			
SO_3	3.05×10^{-4}	$\sim 8\%$ block : complete loss			
COOH	1.68×10^{-4}	10~20% block : minimal loss >50% block : no anticoagulant activity			
NH_2	5×10^{-4}	blocking : minimal loss			

Fig. 3. Choice of attachment group.

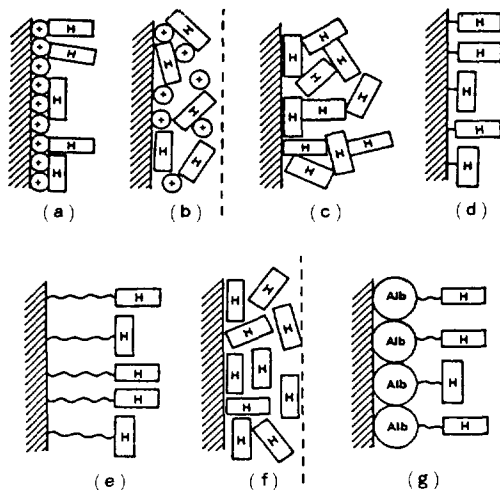


Fig. 4. Various methods for heparinization of surfaces : (a) heparin bound ionically on positively charged surface ; (b) heparin ionically bound polymer used as coating on a substrate polymer ; (c) heparin cross-linked surface ; (d) heparin immobilized surface ; (e) heparin immobilization via spacer arms ; (f) heparin dispersed hydrophobic polymers (heparin releases via diffusion) ; (g) heparin-albumin conjugate-coated surface.

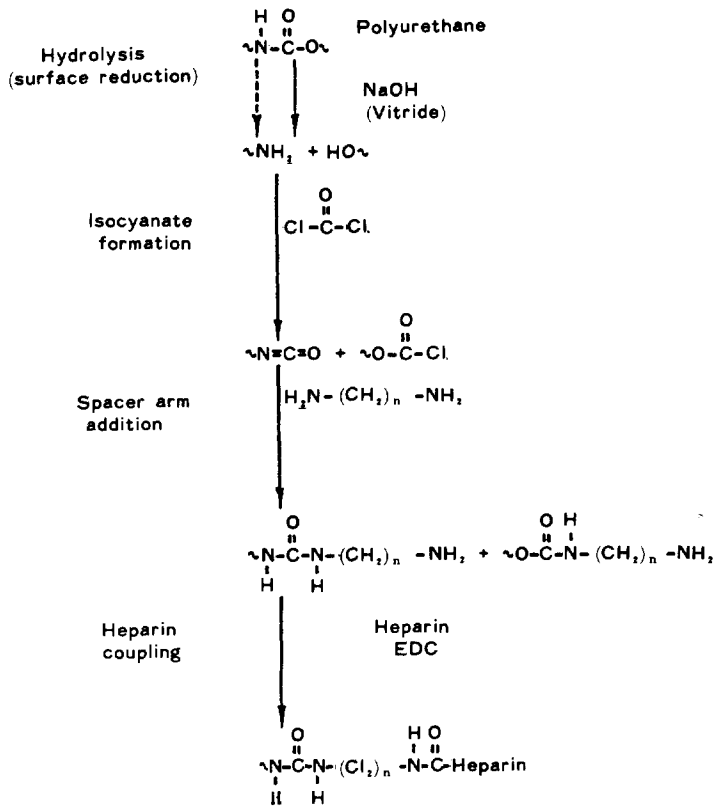


Fig. 5. Heparin-polyurethane immobilization chemistry.

에¹⁶ 나타낸 바와 같이 크게 세가지로 나눌 수 있는데 첫째는 物理적으로 分散시키는 방법, 둘째는 이온결합하는 방법, 셋째는 공유결합하는 방법이 있다. 분산시키는 방법과 이온결합에 의하여 고정화하는 것은 long term상에서 제한이 있기 때문에 장기간 동안 사용하기 위하여 공유결합의 방법이 시도되고 있다.

공유결합

Polyurethane (PU)系 : PU는 生體適合성이 좋지만 내경이 5mm이하에서는 아직도 혈전형성이 문제가 되므로 혈액적합성을 개선하기 위하여 heparin의 고정화가 진행되었는데 유타대학의 Kim's group¹⁷에서는 Fig. 5에서 나타내는 바와 같은 단계로 heparin을 고정하였다. PU표면을 알카리로 가수분해하여 -NH₂기를 도출하고 여기에 phosgene과

반응시켜 -N=C=O기를 만들고 여기에 heparin의 activity를 높이기 위하여 spacer arm으로서 diamino alkane과 반응시키고 최종적으로 heparin의 -COOH기와 공유결합시키기 위하여 coupling agent로서 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide (EDC)를 사용하였다. 그 결과 in vitro와 24 hr동안의 in vivo의 결과는 양호하였지만 좀 더 긴 시간의 in vivo에서는 spacer arm이 소수성으로서 효과가 떨어지는 결과가 나왔다. Cho^{18,19} 등은 상기 반응중 2단계에서 phosgene을 사용하지 않고 spacer arm으로서 aminocarboxylic acid가 도입되어 heparin이 고정화되었다. Kim 등²⁰은 Utah대의 group과 달리 spacer arm으로서 친수성을 도입하기 위하여 친수성으로서 poly(ethylene glycol) (PEG) (Fig. 6참조)을 도입하여

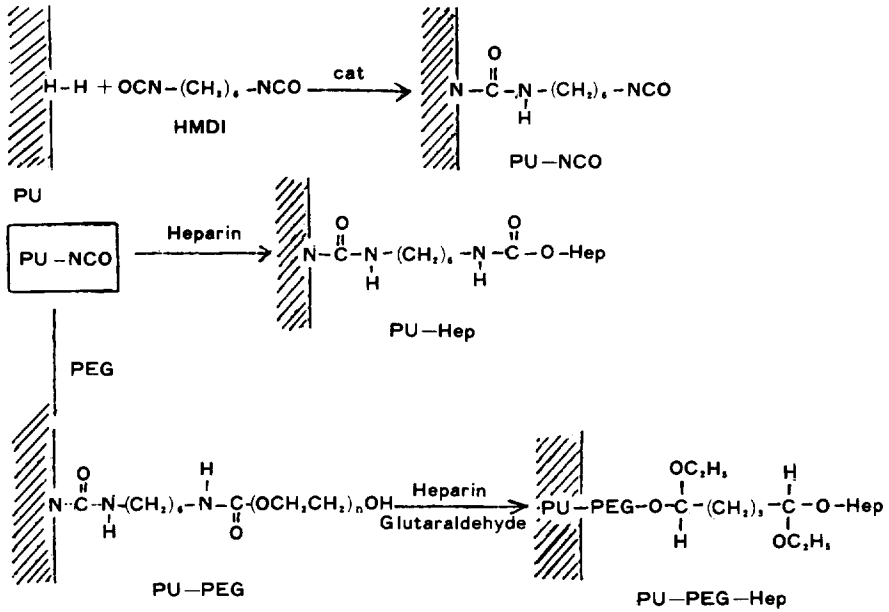
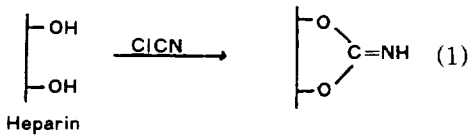


Fig. 6. Reaction scheme of heparinization on polyurethane.

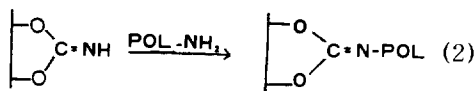
시도하였던 바 *in vitro*와 *in vivo*에서 좋은 결과를 나타냈다. Plate²¹도 PU에 heparin을 공유결합으로 고정하였는데 그 화학반응 과정은 불분명하다.

Polysilicone 系

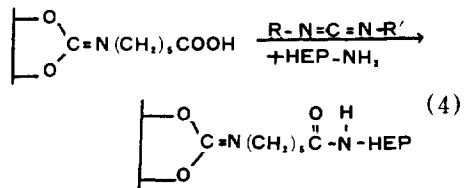
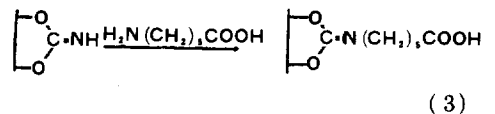
Porath²²은 (1)식에 나타내는 바와 같이 heparin



의 -OH기에 cyanuric chloride (ClCN)를 반응시킨 후 (2)식에서와 같이, polysilicone에 amino-propyltriepoxysilane을 처리하여 표면에 amino



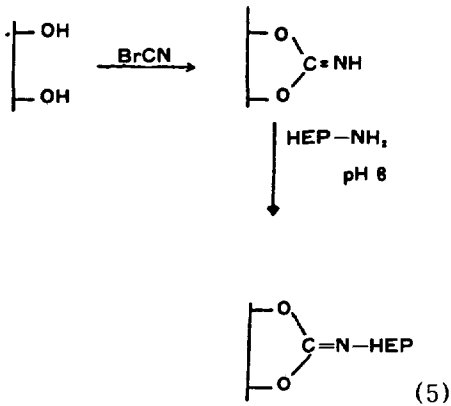
group을 도출시켜 (1)식의 반응생성물과 공유결합을 시도하였다. 그러나 고정후의 heparin의 활성은 검토되지 않았다. Hoffman²³은 polysilicone에 -OH기를 도입하기 위하여 hydroxyethyl methacrylate (HEMA)와 N-vinyl pyrrolidone (NVP)을 포함한 용액을 방사선 graft중합시켰다. 여기에 (1)식과 같이 ClCN을 반응시켜 얻은 생성물에 (3)식과 같이 ϵ -aminocaproic acid (ϵ -ACA)를 반응시켜 spacer arm을 도입하였다. 여기에 (4)식과 같이 coupling agent인 [1-cyclohexyl-3-



(2-morpholino) carbodiimide)를 사용하여 heparin을 고정하였으나 in vivo에서의 결과는 크게 향상되지는 못하였다.

多糖類

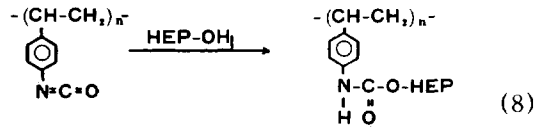
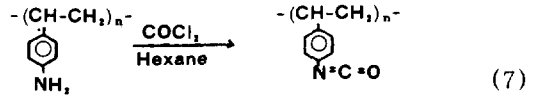
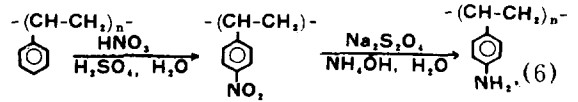
Schmer 등²⁴은 cellulose로 된 hollow fiber 인공신장에 heparin을 고정하기 위하여 (5)식과 같이



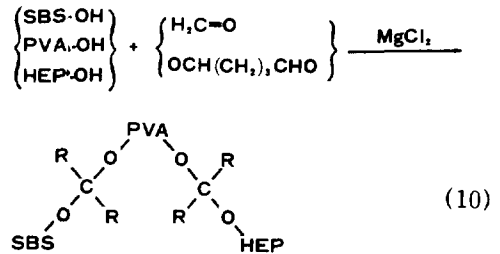
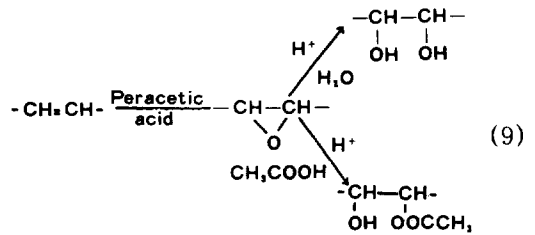
cellulose의 -OH기에 cyanogen bromide를 처리한 뒤에 여기에 알칼리성에서 heparin을 고정하였다. 그러나 어떤 환자에서는 심한 출혈의 부작용이 생겼다. 또한 cellulose와 heparin 사이에 spacer arm의 도입도 시도되었다.²⁵ Ebert 등²⁶도 agarose에 여러가지의 diamino alkanespacer arm을 도입시켜 heparin을 고정한 결과 in vitro의 activated partial thromboplastin time (APTT)에서는 탄소의 수가 8에서 부터 급격히 증가하는 양상을 보였으나 platelet adhesion에서는 탄소의 수에 무관하였다. Danishefsky 등²⁷도 agarose에 spacer arm으로서 aminoethyl기를 도입한 후 heparin을 고정하였다.

Polystyrene (PS)系

Halpern 등²⁸은 PS에 heparin을 고정하기 위하여 (6), (7), 그리고 (8)식에서 나타내는 바와 같이 -NO₂, -NH₂, -N=C=O기의 순으로 도입하여 여기에 heparin을 고정하였는데 이온결합으로 고



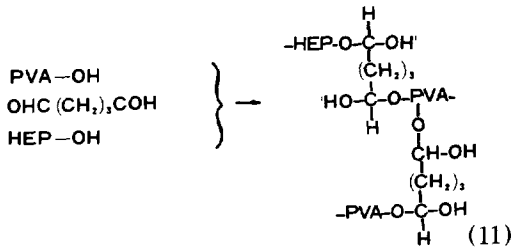
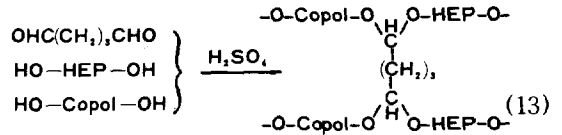
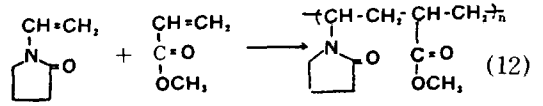
정한 것보다 clotting time이 긴 결과를 나타냈다. Goosen 등²⁹은 styrene-butadiene-styrene 공중합체에서 (9)식과 같이 과산을 사용하여 butadiene에 -OH기를 도입한 후 최종적으로 (10)식과 같이 PVA, SBS-OH, 그리고 heparin을 aldehyde로 처리하여 서로 acetal결합으로 heparin을 고정하였다.



Poly(vinyl alcohol) (PVA)系

Merrill 등³⁰은 PVA, glutaraldehyde, 그리고 heparin을 같이 반응시키면 (11)식과 같이 가교로 이루어진 hydrogel상태의 고분자가 형성되어 whole

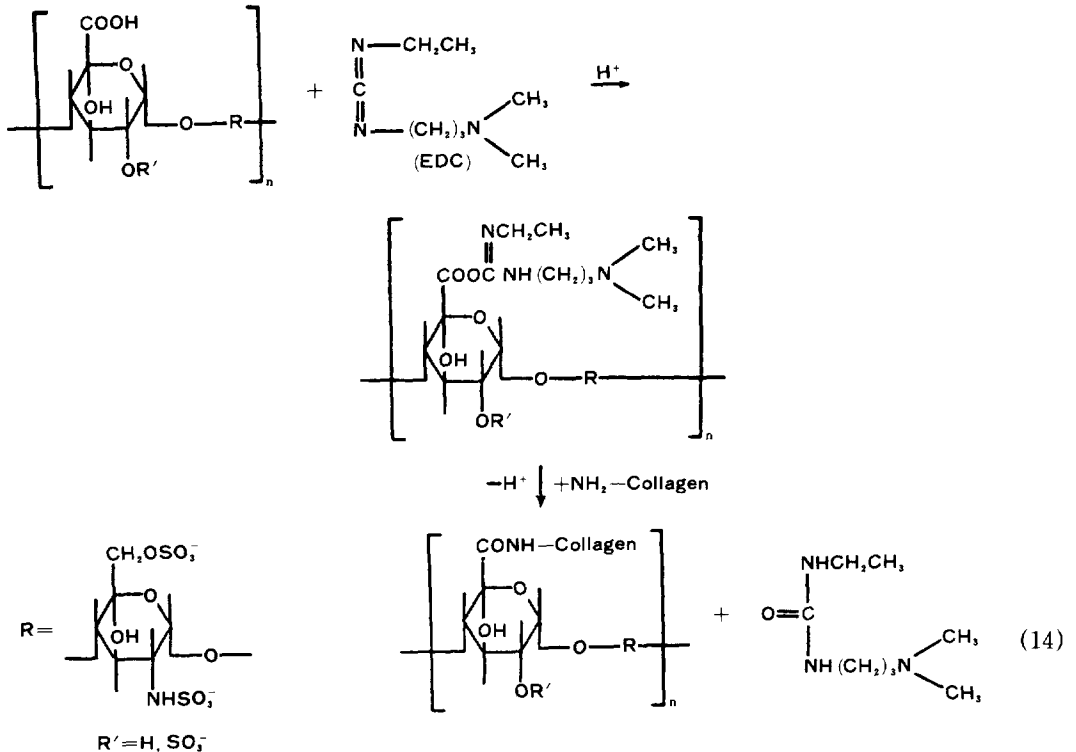
blood clotting time (WBCT)이 길어진다고 보고 하였다. Goosen등³¹도 Table 1에서 나타내는 조성으로 PVA에 heparin을 고정하였다. Peppas등³²은 PVA의 기계적성질을 보강하기 위하여 PVA를 방사선으로 가교시킨 뒤 heparin을 고정화하였다. 또한 그들은 (12)식과 같이 NVP와 vinyl acetate (VA)를 방사선으로 공중합한 후 VA를 알카리로



가수분해하여 P(NVP/VA)를 얻은 후 (13)식과 같이 glutaraldehyde로 처리하여 heparin과 acetal 결합을 이루면서 고정하였다.³³

Table 1. Heparin-Polyvinyl Alcohol Hydrogel Formulation

	%(w/w)	μ moles / gm solution
Polyvinyl alcohol	10	1
Glutaraldehyde	0.5	50
Formaldehyde	3	10^3
$\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	5	2.5×10^2
Glycerol	4	4.3×10^2
Heparin	1	0.67



Collagen

Raghunath 등³⁴ 은 (14)식과 같이 heparin의 COOH기를 EDC로 활성화하여 collagen의 -NH₂기와 결합시킨 결과 상당히 안정된 결합을 하고 있음을 나타냈다.

기 타

Labarre 등³⁵은 heparin-MMA 공중합체를 만들기 위하여 cerium (IV)염과 반응시키면 라디칼이 발생되어 이것이 MMA 단량체를 중합시킨다고 보고하였으나 증가된 clotting time은 공유결합되지 않은 heparin의 방출때문이라고 논하였다. Miura 등³⁶은 P(HEMA)의 -OH기를 CNBr로 처리한 후 여기에 heparin을 고정하여 plasma recalcification 을 측정하였더니 큰 향상을 보였다고 보고하였다.

結 言

Heparin의 관능기와 여러가지 고분자가 갖는 관능기와의 공유결합 방법에 대하여 설명하였다. 위에서 설명한 바와 같이 공유결합에 의하여 heparin이 장기간 동안 안정되었지만 heparin의 생물학적 활성은 고분자 종류, 결합방법, in vitro방법, 그리고 in vivo에서 동물의 선택에 따라서 다른 양상을 보이고 있을 정도도 복잡하였다. 따라서 heparin으로 고정화된 醫用材料를 최종적으로 이용하기 위해서는 조직적인 임상전의 검토와 동물에서의 완전한 평가가 이루어져야 되리라고 본다.

사사: 총설을 쓰는데 자료를 제공해준 유타대학교의 박기동씨와 정리해준 송수창군에게 사의를 표합니다.

참 고 문 헌

1. 日本化學會編, 化學總說 21, 學會出版センター(1978).
2. 今西幸男, 高倉孝一, 丹沢宏編: 化學增刊, 84, 化學同人(1980).
3. 今西幸男, 桜井靖久, 妹尾學, 竹本喜一編: 講

談社サイエンステイフイク 1982.

4. 鶴田禎二, 桜井靖久編: 化學の領域増刊, 134, 135, 南江堂 1982.
5. Mechanical Surfaces and Gas Layer Effects on Moving Blood. In Varco RL (ed): Federation Proceedings 30, 1971.
6. The Behavior of Blood and its Components at Interfaces. Vroman L, Leonard EF (eds): *Ann NY Acad Sci.*, 283, 1977.
7. Biomaterials: Interfacial Phenomena and Applications. Cooper SL, Peppas NA (eds): *ACS Advances in Chemistry Series* 199, 1982.
8. 片岡一則, 高分子(日本), 35, 72(1986).
9. J. D. Andrade, H. B. Lee, M. S. Jhon, S. W. Kim, and J. B. Hibbs Jr.: *Trans ASAIO*, 19, 1(1973).
10. T. Okano, S. Nishiyama, I. Shinohara, T. Akaike, Y. Sakurai, K. Kataoka, and T. Tsuruta. *J. Biomed. Mat. Res.*, 15, 393(1981).
11. H. A. Scheraga, "タンパク質の構造" 共立出版(1976).
12. C. D. Dietrich and S. C. M. Dietrich, *Cienc. Cult. Sao Paulo*, 26, 55(1974).
13. L. B. Jaques, *Science*, 206, 528(1979).
14. R. D. Rosenberg and P. S. Damus, *J. of Biological Chem*, 248, 6490(1973).
15. C. D. Ebert, E. S. Lee, J. Deneris and S. W. Kim, *ACS Advances in Chemistry Series*, 199, 1982, p161.
16. S. W. Kim and J. Feijen, *CRC Critical Reviews in Biocompatibility*, 1, 229(1985) by CRC Press. Inc.
17. P. W. Heyman, C. S. Cho, J. C. Mcree, D. B. Olsen, and S. W. Kim, *J. Biomed. Res. Mater.*, 19, 419(1985).
18. C. S. Cho and S. W. Kim, *J. of KOSOMSE*, 7, 147(1986).

19. J. M. J. Grevelink, S. F. Mohammad, C. S. Cho, G. M. Pantalo, S. D. Hughes, B. Y. Ching, Y. Tanaka, S. W. Kim, D. B. Olsen, and W. J. Kolff, *Trans. Am. Soc. Artif. Intern. Organs*, **31**, 377(1985).
20. Y. H. Kim, K. D. Ahn, S. Y. Jeong, K. D. Park, D. K. Han, H. I. Cho, and S. H. Kim, *Asian Chemical Congress*, July 3, 1987, Seoul, Korea.
21. N. A. Plate and L. I. Valuev, *Biomaterials*, **4**, 14(1983).
22. J. Porath, R. Axen, and S. V. Ernback, *Nature*, **215**, 1491(1967).
23. A. S. Hoffman, G. Schmer, C. Harris, and W. G. Kraft, *Trans. Am. Soc. Artif. Intern. Organs*, **18**, 10(1972).
24. G. Schmer, L. N. L. Teng, J. E. Vizzo, U. Graife, Milutinovich, J. J. Cole, and B. H. Scribner, *Trans. Am. Soc. Artif. Intern. Organs*, **24**, 404(1978).
25. G. Schmer, *Trans. Am. Soc. Artif. Intern. Organs*, **18**, 321(1972).
26. C. D. Ebert and S. W. Kim, *Thromb. Res.*, **26**, 43(1982).
27. I. Danishefsky and F. Tzeng, *ibid*, **4**, 237 (1974).
28. B. D. Halpern and R. Shibakawa, *Adv. Chem. Ser.*, **87**, 197(1968).
29. M. F. A. Goosen and M. V. Sefton, *J. Biomed. Mater. Res.*, **13**, 347(1979).
30. E. W. Merrill, E. W. Salzman, D. S. L. Wong, T. P. Ashford, A. H. Brown, and W. G. Austen, *J. Appl. Physiol.*, **29**, 723(1970).
31. M. F. A. Goosen and M. V. Sefton, *J. Biomed. Mater. Res.*, **17**, 359(1983).
32. N. A. Peppas and E. W. Merrill, *J. Biomed. Mater. Res.*, **11**, 423(1977).
33. N. A. Peppas and T. W. B. Gehr, *Trans. Am. Soc. Artif. Intern. Organs*, **24**, 404(1978).
34. K. Raghunath, G. Biswas, K. Panduransa Rao, K. T. Joseph and M. Chrapil, *J. Biomed. Mater. Res.*, **17**, 613(1983).
35. D. Labarre, M. C. Boffa, and M. Jozefowicz, *ibid*, **11**, 283(1977).
36. Y. Miura, S. Aoyugi, et al., *ibid*, **14**, 679(1980).